Versuche zum Nachweis von Sarkosporidien-Infektionen bei Haustieren mit dem Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)

Uta Klima

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535715_0020

Aus dem Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie des Fachbereichs Tiermedizin der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. J. Boch

Versuche zum Nachweis von Sarkosporidien-Infektionen bei Haustieren mit dem Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Uta Klima
aus
Bielefeld

München 1979

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Kräußlich
Referent: Prof. Dr. Dr.h.c. J. Boch
Korreferent: Prof. Dr. P.A. Bachmann

Tag der Promotion: 23. Februar 1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DISSERTATIONS– UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Meinen lieben Eltern in
Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Seite

I. Einleitung 1

II. Serologische Untersuchungen an Sarcocystis-infizierten Haustieren und Menschen (anhand der Literatur) 2

III. Eigene Untersuchungen

A. Material und Methoden 10

1. Antigengewinnung 10

2. Antigenfraktionierung 11

3. Der ELISA im Mikrosystem 12

4. Trypsin-Verdauungs-Methode 14

B. Ergebnisse 15

1. Reaktionen verschiedener Sarkosporidien-Antigene im ELISA mit Seren von experimentell infizierten Tieren 17

a) Schwein 17

b) Rind 18

c) Hund 21

2. Anwendung des ELISA zum serologischen Nachweis von Sarkosporidien-Infektionen bei Rindern und Schweinen im Vergleich zum mikroskopischen Erreger-Nachweis 23

IV. Besprechung der Ergebnisse 26

V. Zusammenfassung 32

Summary 33

VI. Literaturverzeichnis 34

Lebenslauf

I. Einleitung

Durch die zunehmende Aufklärung von Struktur, Entwicklung und Wirtsspezifität haben die Sarkosporidien in den letzten Jahren große Bedeutung erlangt.
Insbesondere diejenigen Sarkosporidienarten, die den Hund als Endwirt haben, können bei Tieren aller Altersstufen zu erheblichen Krankheitserscheinungen wie Fieber, Apathie, Freßunlust, Anämie, zentralnervösen Störungen und sogar zum Tod führen. Die Tatsache, daß auch der Mensch durch die verbreitete Gewohnheit, rohes Fleisch zu verzehren, als Endwirt ständiger Infektionsgefahr ausgesetzt ist, macht eine sichere, schnell und einfach durchzuführende Diagnosestellung notwendig.
Meine Aufgabe war es nun, Antigen von verschiedenen Sarkosporidienarten herzustellen und anschließend zu überprüfen, ob der ELISA, eine Immun-Enzym-Methode, als serologischer Test geeignet ist, eine Sarkosporidien-Infektion vor allem beim Zwischenwirt nachzuweisen, ob Kreuzreaktionen mit anderen zystenbildenden Kokzidienarten vorliegen, ob der Test für Routineuntersuchungen angewendet werden kann und ob eventuell eine Differenzierung der einzelnen Arten mit Hilfe des ELISA möglich ist.

II. Serologische Untersuchungen an Sarcocystis-infizierten Haustieren und Menschen (anhand der Literatur)

Wie bei den meisten Protozoenerkrankungen hat die Serodiagnostik auch bei den Sarkosporidieninfektionen zunehmende Bedeutung erlangt. Da über die Pathogenität der Sarkosporidien beim Endwirt Mensch noch keine Klarheit herrscht, sind serologische Untersuchungen hier vor allem in prophylaktischer Hinsicht von Interesse. Über die Pathogenität bei unseren Haustieren liegen einige Arbeiten vor.

Daß Sarkosporidien im Zwischenwirt bei Tieren aller Altersstufen zu erheblichen Erkrankungen führen, bewiesen FAYER, JOHNSON und LUNDE (1976). Von 6 oral mit Sporozysten von S.fusiformis vom Hund infizierten Kühen erkrankten alle. Nur eine Kuh brachte ein gesundes Kalb zur Welt. Eine Kuh wurde nach 60 Tagen moribund getötet, trug aber einen normal entwickelten Fetus, 2 Kühe abortierten und 2 Tiere blieben steril.
LEEK und FAYER (1978) stellten bei Sarkosporidien-infizierten Schafen Aborte fest. Von 11 oral mit 50.000, 100.000 oder 500.000 Sporozysten von S.ovicanis infizierten, trächtigen Schafen abortierten 8 Tiere. 4 der 15 Feten waren abgestorben. Die restlichen 3 Schafe lammten zwar normal ab, doch nur 2 davon brachten lebensfähige Lämmer zur Welt. Alle infizierten Schafe zeigten ab dem 21.Tag p.i. einen Temperaturanstieg bis 40,9°C, Anämie, Inappetenz, Gewichtsverlust und zentralnervöse Störungen. 4 Tiere wurden moribund getötet. Je größer die zugeführte Sporozystenmenge war, desto heftiger war der Krankheitsverlauf. Keines der Schafe, denen 500.000 Sporozysten verabreicht worden waren, trug lebensfähige Lämmer aus.
Die Untersuchungen von [illegible] (1978) zeigten, daß Sarkosporidien auch beim Schwein zu Aborten führen. 5 trächtige Muttersauen wurden mit je 50.000 Sporozysten von S.suicanis infiziert. Am 12.Tag p.i. zeigten alle Sauen erhöhte Temperatur (40,4° - 41,4°C). Ein Tier abortierte noch am selben Tag, ein zweites am 14.Tag p.i.. Eine Sau wurde am 58.Tag p.i. in mori-

bundem Zustand getötet und 2 Tiere ferkelten termingerecht. Bei allen konnte gestörtes Allgemeinbefinden und Hinterhandschwäche nachgewiesen werden. Bei Infektion im letzten Trächtigkeitsdrittel wurden keine Aborte festgestellt. Wie beim Rind und Schaf kann auch beim Schwein die Sarkosporidienart, die den Hund als Endwirt hat (S.bovicanis, S.ovicanis, S.suicanis), als Abortursache angesehen werden.

Die besonders große Pathogenität der Sarkosporidien für Jungtiere wird aus den Untersuchungen von FAYER und JOHNSON(1973) sowie GESTRICH, HEYDORN und BAYŠU (1975) ersichtlich. Die Autoren infizierten Kälber mit Sporozysten von Mensch, Hund und Katze und stellten fest, daß vor allem die Sporozysten vom Hund zu schweren Krankheitserscheinungen wie Fieber, Apathie, verminderter bis sistierender Futteraufnahme, steifem Gang, Anämie und sogar zum Tod führten. GESTRICH, SCHMITT und HEYDORN (1974) und LEEK, FAYER und JOHNSON (1977) beobachteten ähnliche Krankheitserscheinungen bei Lämmern, die mit Sporozysten von S.ovicanis infiziert worden waren, wobei die Schwere der Erkrankung von der verabreichten Sporozystenmenge abhing. Auch die Versuche von HEYDORN (1977) mit Ferkeln, die mit 500.000 bis 5 Mill. Sporozysten von S.suihominis infiziert worden waren, führten, abhängig von der zugeführten Menge, zu schweren Erkrankungen, die sich in Fieber, Apathie, Freßunlust, angestrengter Atmung, Benommenheit, schwankendem Gang und zentralnervösen Störungen äußerten und auch teilweise zum Tod führten.

Die Beobachtungen von CRAIGE (1977) widerlegten die Behauptung von DUBEY (1976), daß Sarkosporidien für den Endwirt nicht pathogen seien. Alle Hunde, bei denen Sporozysten in den Fäzes gefunden wurden, wiesen chronische Darmerkrankungen auf, die nach Behandlung mit Sulfamethazin verschwanden.

Diese Beispiele zeigen, wie wichtig eine frühzeitige Diagnosestellung ist. Die Serodiagnostik hat hierbei eine große Bedeutung.

Die anfänglichen serologischen Untersuchungen an Tieren mit Sarkosporidienbefall sollten vor allem klären, ob eine Verwandt-

schaft zwischen Toxoplasma und Sarcocystis besteht. MÜHLPFORDT (1951) verwendete den Sabin-Feldman-Test (SFT) zum Nachweis von Sarkosporidien, ohne eine eventuelle Kreuzreaktion mit Toxoplasmen zu berücksichtigen. Er verfütterte Zysten aus Hammelschlünden an SFT-negative Meerschweinchen, Ratten und Goldhamster und beobachtete bei allen Tieren Titer bis 1:400 über längere Zeit. Weiterhin fand er bei der Untersuchung von 45 Schafen 12 Tiere mit makroskopischen Zysten und positiven SFT-Titern. 10 Tiere wiesen zwar keine Zysten, aber trotzdem Titer auf. 23 Schafe zeigten weder Zysten noch Titer. Dagegen fanden SCHMIDT-HOENSDORF und HOLZ (1953) mit Hilfe des SFT, daß auch bei Verwendung Sarkosporidien-negativer Seren fragliche oder positive Ergebnisse auftraten, und daß befallene Tiere negativ reagierten. Sie schlossen daraus, daß keine verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen Toxoplasmen und Sarkosporidien bestehen. Auch PIEKARSKI und SAATHOFF (1961) beobachteten weder im SFT noch in der Komplement-Bindungsreaktion (KBR) Anhaltspunkte für eine Antigen-Gemeinschaft. Sarkosporidien-freie Schafe ergaben mit Toxoplasma-Antigen im SFT Titer von 0 bis 1:4000; 20 Schafe mit starker Sarkosporidien-Infektion waren dagegen im SFT eindeutig negativ. Mischinfektionen mit Toxoplasma konnten hierbei nicht ausgeschlossen werden. Die KBR funktionierte nur mit homologem Antigen.

Den ersten Versuch, die KBR zur Sarkosporidiendiagnose zu verwenden, machte AWAD (1958). Von 25 Schafen mit einer feststellbaren Infektion waren 20 Tiere in der KBR mit Sarkosporidien-Antigen positiv, mit Toxoplasma-Antigen negativ. Titer von 1:10 wurden als signifikant angesehen. Die KBR wurde als spezifischer, wenn auch mehr für aktive Infektionen gebräuchlicher Test zur Sarkosporidiendiagnose und zur Differenzierung von Toxoplasmen empfohlen.

Eine weitere Arbeit von PIEKARSKI, SCHÄFER und NIEDERLÄNDER (1961), die sich mit mikroskopischen und serologischen Studien über die Häufigkeit von S.tenella beim Schaf befaßt, ergab eine Befallsrate von 97 %. Auch hier fand die KBR Anwendung. Von 223

natürlich infizierten Schafen waren in der KBR 67 negativ und 156 positiv, 217 jedoch mikroskopisch positiv. Daraus wird ersichtlich, daß die mikroskopische Untersuchung der KBR überlegen ist, da jene nur einen bestimmten immunologischen Zustand im Ablauf der Infektion anzeigt.

Die Rolle des Hundes in der Epidemiologie der Schafsarkosporidiose untersuchten MUNDAY und CARBOULD (1974) ebenfalls mit Hilfe der KBR. Das Antigen wurde aus makroskopisch sichtbaren Zysten vom Schaf gewonnen. Von 339 Seren von Schafen, die ohne Kontakt mit Katzen gezüchtet wurden, enthielten 338 Antikörper gegen Sarcocystisarten. Mit infiziertem Schaffleisch gefütterte Welpen schieden ab dem 14.Tag p.i. Sporozysten aus, womit wiederum ein 10 Tage altes Zwillingslamm infiziert wurde. Keines der beiden Zwillingslämmer wies bis zum Alter von 22 Tagen in der KBR Antikörper auf. Erst im Alter von 41 Tagen zeigte das infizierte Lamm KBR-Reaktionen mit einem Titer von 1:40. Eine kongenitale Übertragung schien also offenbar nicht vorzuliegen.

Den Befall australischer Schlachttiere mit Sarkosporidien stellte MUNDAY (1975) unter Verwendung der KBR fest. Er entnahm Muskelproben, die er mikroskopisch untersuchte, und Seren von Rindern, Schafen und Schweinen. Rinder waren serologisch zu 92,9 %, Kälber zu 95,3 %, Schafe zu 99,3 % und Lämmer zu 97,7 % KBR-positiv. Bei Schweinen erwies sich die KBR als unzuverlässig.

Seren von 50 Büffeln und 25 Rindern an einem indischen Schlachthof untersuchten SHUKLA und VICTOR (1976) mit der KBR. Alle 50 Büffel waren KBR-positiv (100 %), 19 davon aber ohne eine makroskopisch und histologisch bestimmbare Infektion. Von den 25 Rindern waren 21 KBR-positiv (84 %), 17 Tiere wiederum ohne mikroskopisch feststellbare Parasiten. 2 experimentell mit Sporozysten vom Hund infizierte Büffelkälber sowie ein Kontroll-Kalb zeigten positive KBR-Titer; der Sarkosporidienbefall wurde makroskopisch und histologisch bestätigt. Ein von Kaninchen gewonnenes Hyperimmunserum führte zu Endtitern bis 1:160.

Serologische Untersuchungen von DE ANDRADE und WEILAND (1971) zur Feststellung gemeinsamer Antigene von Sarkosporidien, Toxoplasmen und Kokzidien mittels der Mikro-Agar-Präzipitation,

dem indirekten Fluoreszenztest (IFAT) und dem SFT ergaben, daß Sarkosporidien mit Toxoplasmen und verschiedenen Eimeria- und Isosporaarten keine Kreuzreaktionen eingehen.
TADROS, LAARMANN und VON DEN BIJK (1974) verwendeten ebenfalls den IFAT, um zirkulierende Antikörper in Seren von Isospora hominis-Trägern (S.bovihominis und S.suihominis) nachzuweisen, indem sie das Antigen aus Zysten von S.fusiformis des Rindes gewannen. Als Kontrolle dienten Seren von pathogenfreien Mäusen oder 3 - 6 Monate alten Säuglingen. Für die Routine-Serologie zur Erkennung von Infektionen des Menschen mit Sarkosporidien schlugen sie vor, Antigen von S.tenella zu verwenden, da es mit S.fusiformis kreuzreagiert und in reinerer Form und in größeren Mengen zu gewinnen ist. Auch sie stellten keine Kreuzreaktionen mit Toxoplasmen im SFT und IFAT fest.
Den immundiagnostischen Nachweis einer experimentellen S.bovicanis-Infektion beim Rind führten NEDJARI, JUNGMANN und HIEPE (1976). Sie infizierten 6 Kälber im Alter von 10 Wochen mit Sporozysten aus dem Hundekot und untersuchten die Seren mit dem IFAT in 7-tägigen Abständen über einen Zeitraum von 3 Wochen vor bis 15 Wochen nach der Infektion. Die Negativ-Kontrollen stammten von einem 48 Stunden alten Kalb und 2 nicht infizierten Kontroll-Kälbern. Die ersten positiven Reaktionen zeigten sich in der 4. bzw. 5.Woche p.i.. Ab der 5. bis zur 11. bzw. 12.Woche p.i. kam es bei allen infizierten Kälbern zum Titeranstieg. Die Titer lagen allgemein zwischen 1:40 und 1:640. Die Negativ-Kontrollen blieben reaktionslos. Die trichinoskopische und histologische Untersuchung bei der Schlachtung von 3 infizierten Kälbern 20 Wochen p.i. bestätigte das Ergebnis des IFAT. Dieser Test wird von den Autoren somit als brauchbar zum intravitalen Nachweis der Sarkosporidiose beim Zwischenwirt Rind empfohlen.
Serologische Sarcocystis-Studien an Menschen mit Hilfe des IFAT führten ARYEETEY und PIEKARSKI (1976) durch. 12 Probanden schieden nach Verzehr von rohem, infizierten Rindfleisch 9 bis 179 Tage lang Sporozysten aus, ohne klinische Beschwerden zu zeigen. Bei erneutem Verzehr infizierten Fleisches zeigte sich, daß keine Immunität ausgebildet war und in gleichem Maße erneut Sporo-

zysten ausgeschieden wurden. Unabhängig davon, ob die Probanden Sporozysten ausschieden oder nicht, kam es im IFAT zu Titern bis 1:256, wobei das verwendete Antigen von S.tenella und S.fusiformis stammte. Auch Personen, die angeblich kein rohes Fleisch gegessen hatten, reagierten positiv mit Titern von 1:16 bis 1:64. Die Autoren begründeten dies mit der Tatsache, daß Antikörper gegen Sarkosporidien noch Monate bzw. Jahre nach der Infektion nachgewiesen werden können. Ferner wurde festgestellt, daß durch Kälte- und Hitzeeinwirkung der Antigencharakter der Sarkosporidien verloren geht und daß zwischen Sarkosporidien und Toxoplasmen keine Antigenverwandtschaft besteht.

Den diaplazentaren Übergang von Sarcocystis-Antikörpern bei Mensch und Ratte untersuchten ARYEETEY und PIEKARSKI (1978) unter Verwendung des IFAT. 45 von 308 Serumproben von Kleinkindern bis zum Alter von 3 Monaten waren im IFAT Sarkosporidien-positiv. Bis zum Alter von 2 Wochen waren 28 von diesen 45 Kindern positiv, bis 4 Wochen 13, bis 8 und 12 Wochen jeweils noch 2 Kinder. Offensichtlich waren nur Kleinkinder von Müttern mit höheren Antikörper-Titern nach der Geburt positiv. Die Antikörper wurden diaplazentar übertragen und verschwanden bis zur 12.Lebenswoche aus dem Blut. Auch neugeborene Ratten von serologisch positiven Müttern zeigten zu Beginn dieselben Titerhöhen wie die Muttertiere und wurden bei kontinuierlicher Titerabnahme bis zur 12. Woche negativ. Die Eltern blieben aber weiterhin positiv. Rattenbabies einer negativen Mutter und eines positiven Vaters waren bei Geburt negativ, diejenigen einer positiven Mutter und eines negativen Vaters jedoch positiv. Daraus folgt, daß die Antikörper auch bei der Ratte diaplazentar übertragen werden.

LUNDE und FAYER (1976) versuchten, Sarkosporidien-Antikörper mit der indirekten Hämagglutination und der Agar-Gel-Diffusion nachzuweisen. Das Antigen wurde aus dem Herzmuskel eines künstlich infizierten Rindes gewonnen. 30 - 45 Tage p.i. konnte ein Titeranstieg beobachtet werden, der am 90.Tag p.i. seinen Höhepunkt erreichte. Auch in der Agar-Gel-Diffusion wurden ab dem 30. Tag p.i. Präzipitationen festgestellt, die nach 65 - 90 Tagen sehr ausgeprägt waren.

ATKINSON (1977) verwendete in der Elektrophorese Isoenzyme, um zwischen 3 Sarkosporidienarten beim Rind zu unterscheiden. Er stellte fest, daß 3 verschiedene Arten von Zysten mit 3 Sarkosporidienarten korrespondieren, die Hund, Katze und Mensch als Endwirte haben.

Zur Sarkosporidiendiagnose überprüfte ARCAY-DE-PERAZA (1966) den direkten Agglutinationstest. Das Antigen hierfür stammte aus S.tenella-Zysten von Schafschlünden. Die Seren von 2 Kaninchen und 3 Meerschweinchen, die mit zuvor durch Ultraschall zerstörten Parasitenzysten intraperitoneal infiziert worden waren, ergaben in diesem Test 10 Tage p.i. einen Titer von 1:40, der im Verlauf von 5 Monaten bis auf 1:1280 anstieg und anschließend über eine Dauer von 5 Monaten wieder abfiel. Die Seren von 7 makroskopisch sichtbar infizierten Mutterschafen waren alle positiv. Auch das Serum eines Mutterschafes ohne erkennbare Infektion reagierte positiv mit einem Titer von 1:640. Dies ist erklärlich, da bei Schafen nach heutiger Kenntnis auch nur mikroskopisch nachweisbare Zysten (S.ovicanis) vorkommen. Das Serum eines Mutterschafes mit bereits verkalkten Zysten war jedoch negativ. Nach Meinung der Autorin ergab der Agglutinationstest mit anderen serologischen Tests vergleichbare Ergebnisse, wenn die Seren einen hohen Antikörpergehalt hatten.

FAYER und LUNDE (1977) untersuchten die Veränderung der Serum- und Plasmaproteinspiegel und der IgG- und IgM-Antikörper in 15 Kälbern, die experimentell mit Sarkosporidien vom Hund (S.bovicanis) infiziert waren. Die Gesamt-Serum- und Plasmaproteinspiegel sanken während der frischen Phase der Infektion in der 4. und 5.Woche p.i. zunächst ab, stiegen dann aber in der 7. - 8. Woche p.i. über die der Kontroll-Kälber an. Der anfängliche Abfall wurde mit den reduzierten Serum-Albuminen, der folgende Anstieg mit den steigenden Immunglobulinen in Verbindung gebracht. Die Immunglobulinspiegel stiegen in beiden Fraktionen, IgG und IgM an. 5 Wochen p.i. waren 6 - 9 mal mehr spezifische Antikörper gegen Sarkosporidien in der IgM- als in der IgG-Fraktion zu finden, in der 10. - 13.Woche p.i. jedoch eine 17 - 27 mal hö-

here IgG-Aktivität festzustellen.

In der Literatur zur Serodiagnose von Sarkosporidien wurde der Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA), der von ENGVALL und PERLMANN (1972) entwickelt und von RUITENBERG und Mitarb. (1974) und RUITENBERG, STEVENBERG und BROSI (1975) zum Nachweis von Serum-Antikörpern gegen Trichinella spiralis verwendet wurde, bisher nicht beschrieben. Eine Arbeit von VOLLER und Mitarb. (1976) befaßt sich mit der Anwendung des ELISA zur Diagnose von Malaria, Trypanosomiasis, Chagas-Krankheit, Amoebiasis, Toxoplasmose, Babesiose, Leishmaniose, Schistosomiasis und Onchozerkose. Eine Aussage über Sarkosporidien-Infektionen wird in dieser Arbeit nicht gemacht.

In der vorliegenden Arbeit wird nun die Anwendbarkeit des ELISA zum Nachweis von Serum-Antikörpern gegen Sarkosporidien und zur Artendifferenzierung untersucht.

III. Eigene Untersuchungen

A. Material und Methoden

1. Antigengewinnung

Als Antigene verwendete ich Zystozoiten-Antigen von Sarcocystis ovifelis, S.suihominis, S.ovicanis, S.bovihominis, S.bovicanis und S.suicanis und Sporozoiten-Antigen von S.suicanis sowie einer Sarkosporidienart vom Reh mit Hund als Endwirt.

Zur Herstellung des Zystozoiten-Antigens von S.ovifelis sammelte ich von ca. 500 Schlachtschafen Schlünde und präparierte aus den befallenen Schlünden die bis zu 1 cm großen Zysten möglichst ohne Muskelanteile heraus. Die nach feinstem Zerschneiden und Zerreiben der Zysten gewonnenen Zystozoiten wurden mit Phosphatpuffer (pH 7,2) 1 - 2 Stunden im Zellhomogenisator zermahlen und über Nacht im Kühlschrank auf dem Magnetrührer flotierend extrahiert. Das Detritusmaterial wurde 20 Minuten bei 45.000 g (20.000 Upm) abzentrifugiert, wobei der Überstand das Extrakt-Antigen darstellte, dessen Eiweißgehalt mit Hilfe der Biurett-Methode bestimmt wurde. Auf gleiche Weise stellte ich auch aus den verbleibenden Zystenwandresten Antigen her.
Das Zystozoiten-Antigen von S.bovihominis und S.bovicanis gewann ich aus stark befallenen Rinderschlünden. Die nach Trypsin-Verdauung entstandene, mit Muskelanteilen versetzte Zystozoitensuspension reinigte ich mit Hilfe von Zellulosepulver (TANABE und Mitarb., 1977) folgendermaßen: In einer 10ml-Glasspritze schichtete ich auf Glaswolle und einem Stück Gaze mit ca. 50 µm Maschenweite eine etwa 1 - 2 mm hohe Säule aus Zellulosepulver (QAE-Sephadex der Fa. Pharmacia Fine Chemicals), das mit 0,02 %igem EDTA-Phosphatpuffer [PBS-Coons-Puffer pH 7,2 und 0,02 % Dinatriumsalz der Äthylendiamintetraessigsäure (Idranal® III)] zum Quellen gebracht wurde. Durch diese Säule wurde die Suspension mit einer über einen Gummischlauch verbundenen Einmalspritze langsam hindurchgesaugt und mit EDTA-PBS nachgespült. Auf diese Weise konnte eine weitgehende Reinigung erzielt werden.

Beide Zystozoitensuspensionen wurden, ebenso wie die von S.suihominis, S.ovicanis und S.suicanis, die mir im Institut bereits tiefgefroren zur Verfügung standen, auf die oben genannte Weise zu Antigen weiterverarbeitet.

Zur Herstellung der Sporozoiten-Antigene von S.suicanis sowie einer Sarkosporidienart vom Reh (mit Hund als Endwirt) wurden mir im Institut Sporozystensuspensionen zur Verfügung gestellt, die aus Hundekot mit Hilfe der Zinkchlorid-Kochsalz-Flotation gewonnen worden waren. Diese Suspensionen versuchte ich durch Filtration möglichst von Kotbestandteilen zu befreien. Ähnlich wie bei den oben erwähnten Rinderschlünden bestand die Schwierigkeit darin, die Sporozystensuspensionen von den zum Teil sehr kleinen Kotpartikeln zu reinigen, ohne einen zu großen Sporozystenanteil zu verlieren. Ich verfuhr dabei nach der von FRENKEL, HOFF und CESSNA (1972) beschriebenen Methode wie folgt: In den Kolben einer 10 ml-Glasspritze füllte ich eine ca. 2 cm hohe Säule aus Glaskügelchen mit einem Durchmesser von 160 - 200 µm (Fa. Serva, Heidelberg), durch welche die Sporozystensuspension gesaugt und mit Phosphatpuffer (pH 7,2) nachgespült wurde; dabei konnten zumindest 2/3 der Kotpartikel eliminiert werden. Die weitere Antigenaufbereitung geschah wie bei den Zystozoiten.

2. Antigenfraktionierung

Die säulenchromatographische Auftrennung des Zystozoiten- und des Zystenwand-Antigens von S.ovifelis, der Zystozoiten-Antigene von S.suihominis, S.ovicanis und S.bovihominis und der beiden Sporozoiten-Antigene erfolgte an Ultrogel ACA 22 und 44. Die Gelbetthöhe betrug 53 bzw. 52 cm, der Durchmesser 24 mm. Als Elutionsflüssigkeit verwendete ich entlüfteten Phosphatpuffer (pH 7,2). Die automatisch gesammelten Fraktionen waren durch die Elutionskurven gekennzeichnet. Die Messungen erfolgten bei 254 nm. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 18 ml/Std.. Die einzelnen Fraktionen wurden tiefgefroren bei - 20°C gelagert.

3. Der ELISA im Mikrosystem

Die verschiedenen Sarkosporidien-Antigene und ihre Fraktionen untersuchte ich im Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) nach ENGVALL und PERLMANN (1972). Bei diesem Test handelt es sich um eine Immun-Enzym-Methode, bei der spezifische Serum-Antikörper durch Enzym-gekoppelte Antiglobuline in Antigen-beschichteten Polystyrol-Mikrotiterplatten nachgewiesen werden können. Der Kunststoff Polystyrol besitzt die Fähigkeit, Proteinmoleküle (in diesem Fall Antigene) an seiner Oberfläche zu binden. Diese Antigene reagieren dann mit den Serum-Antikörpern. Das nach Zugabe von an Peroxydase gekoppeltem Antiglobulin in den Platten spezifisch gebundene Enzym spaltet ein Substrat und führt zu einer Farbreaktion, die den Antikörpergehalt sichtbar macht und eine Titerbestimmung ermöglicht.
Im ELISA untersuchte ich alle mir zur Verfügung stehenden Antigene und ihre Fraktionen in folgendem Arbeitsgang: In jede Vertiefung der Polystyrol-Mikrotiterplatten wurden 0,05 ml des jeweiligen mit Natriumcarbonatpuffer (pH 9,6) verdünnten Antigens einpipettiert, wobei die günstigste Eiweißkonzentration zwischen 10 und 25 µg/ml lag; anschließend wurde 2 Stunden bei 37°C inkubiert und die Antigenlösung mit Leitungswasser ausgewaschen. In die erste Lochreihe legte ich 3 x 0,05 ml PBS-Coons-Puffer, mit 2 % Rinderalbumin versetzt, vor, in die übrigen Vertiefungen je 0,05 ml. Dann erfolgte die Zugabe von je 0,01 ml der entsprechenden Seren in die erste Lochreihe. Von dieser ausgehend wurde mit Mikrodilutern (Mikrotitersystem der Fa. Cooke, Größe 0,05 ml) eine Verdünnungsreihe von 1:16, 1:32, 1:64 usw. hergestellt, 1 Stunde bei 37°C inkubiert und 3 mal gründlich mit Leitungswasser ausgespült. Nach Zugabe von je 0,05 ml an Peroxydase gekoppeltem Antiglobulin (Anti-Hund und Anti-Schwein Globulin-PO der Fa. Paesel, Anti-Rind Globulin-PO der Fa. Nordic) in der Verdünnung von 1:1600 bzw. 1:300 wurde wiederum 1 Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend ausgewaschen. Durch Hinzufügen von Substrat, bestehend aus Amino-Salizylsäure [400 mg 5-Amino-2-Hydroxybenzoesäure ($C_7H_7NO_3$) in 500 ml Aqua dest. aufgelöst und mit 1N NaOH auf pH 6 gebracht], mit 0,05 %iger H_2O_2-Lösung

im Verhältnis 10 : 1 vermischt, konnte der Antigen-Antikörper-Komplex sichtbar gemacht und der Titer 1 Stunde nach Zugabe des Substrates abgelesen werden.

Im ELISA untersuchte ich mit den verschiedenen Antigenen die Seren von Schweinen, Rindern und Hunden. Bei den Schweinen handelte es sich um Seren von 2 mit S.suihominis experimentell infizierten Ferkeln jeweils vom 99. und 128.Tag p.i. sowie von 2 mit S.suicanis experimentell infizierten Schweinen, wobei das Serum des einen Schweines zu Beginn, dasjenige des anderen auf dem Höhepunkt der Infektion gewonnen worden war. Die Negativ-Kontrolle stammte von einem Versuchstier vor der Infektion. Ferner verwendete ich Seren von 2 ebenfalls mit S.suicanis experimentell infizierten Schweinen, die in bestimmten Abständen über die ganze Versuchsdauer bis zur Schlachtung gewonnen worden waren. Auch die Seren von 2 mit S.suicanis experimentell infizierten Muttersauen am 48.Tag p.i. sowie ihrer Ferkel nach Kolostralmilchaufnahme kamen zur Anwendung.
Die Rinderseren stammten von 28 gesunden Rindern und von einem mit S.bovifelis experimentell infizierten Schwarzbunten Bullenkalb. Die Seren dieses Kalbes standen mir ab dem 40.Tag p.i. über die gesamte Versuchsdauer bis zur Schlachtung am 160.Tag p.i. zur Verfügung. Im Fleisch konnten zu diesem Zeitpunkt mikroskopisch jedoch keine Zystozoiten mehr nachgewiesen werden. Als Negativ-Kontrolle diente foetales Kälberserum.
Bei den Hunden handelte es sich um 3 Beagles, die bereits 5 bzw. 7 Monate vor der Serumgewinnung mit infiziertem Hirsch- bzw. Rehfleisch gefüttert worden waren und daraufhin Sporozysten ausgeschieden hatten. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme hatte keine Ausscheidung mehr stattgefunden. Als Negativ-Kontrolle dienten Seren von gnotobiotischen Hunden, die uns dankenswerterweise das Institut für Versuchstierkunde und Versuchstierkrankheiten der FU Berlin zur Verfügung stellte.
Um eventuelle Kreuzreaktionen auszuschließen, verwendete ich außerdem negative und positive Toxoplasma- und Hammondia-Seren von Hunden, Schweinen und Kaninchen.

4. Trypsin-Verdauungs-Methode

Die Anwendbarkeit des ELISA in der Praxis überprüfte ich schließlich an je 100 Rinder- und Schweineproben, wobei ich von jedem Tier nach der Schlachtung gleichzeitig Blut und ein Stück vom Oesophagus (Rinder) bzw. vom Zwerchfell (Schweine) entnahm. Die kleingeschnittenen Muskelproben wurden nach ERBER (1977) mit Trypsinlösung (2,5 g Trypsin auf 1000 ml PBS) versetzt, 30 Minuten auf dem Magnetrührer verdaut, durch ein Teesieb filtriert und 5 Minuten bei 700 g (2000 Upm) zentrifugiert. Der mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnte Bodensatz wurde mikroskopisch auf Zystozoiten untersucht und die Proben je nach Befallstärke in schwach und stark positiv unterteilt.
Das aus dem Blut gewonnene Serum testete ich im ELISA; als Antigen diente Zystozoiten-Antigen von S.ovifelis in einer Eiweißkonzentration von 25 µg/ml.

B. Ergebnisse

Die mir in ausreichender Menge zur Verfügung stehenden Antigene versuchte ich säulenchromatographisch an ACA 22 bzw. 44 aufzutrennen, um festzustellen, ob eine unterschiedliche Antigenverteilung in den Fraktionen stattfindet und ob eine eventuelle Artendifferenzierung oder zumindest eine Unterscheidung zwischen Zystozoiten- und Sporozoiten-Antigenen auf diesem Weg möglich ist.

Die Zystozoiten-Antigene von S.ovifelis, S.suihominis und S.ovicanis ließen sich in jeweils 2 Fraktionen auftrennen, die jedoch nur bei S.ovifelis (Abb.1) und S.suihominis (Abb.2) ausgeprägt waren.

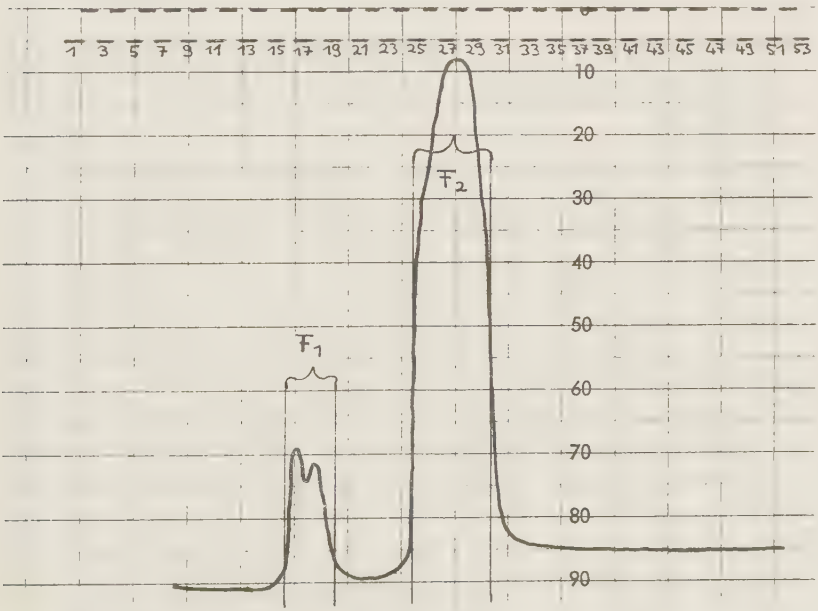

Abb. 1: Elutionskurve des Zystozoiten-Antigens von S.ovifelis aufgetrennt an Ultrogel ACA 22 mit Darstellung der Fraktionen

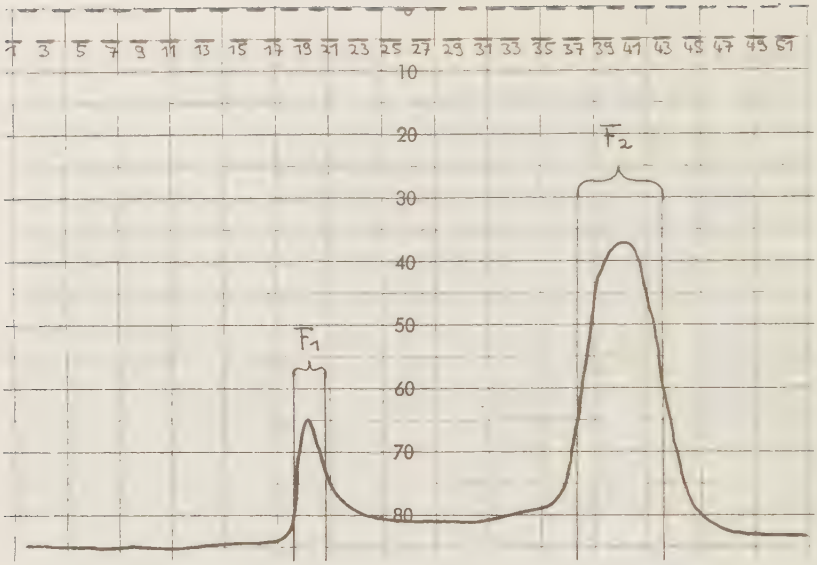

Abb. 2: Elutionskurve des Zystozoiten-Antigens von S.suihominis aufgetrennt an Ultrogel ACA 44 mit Darstellung der Fraktionen

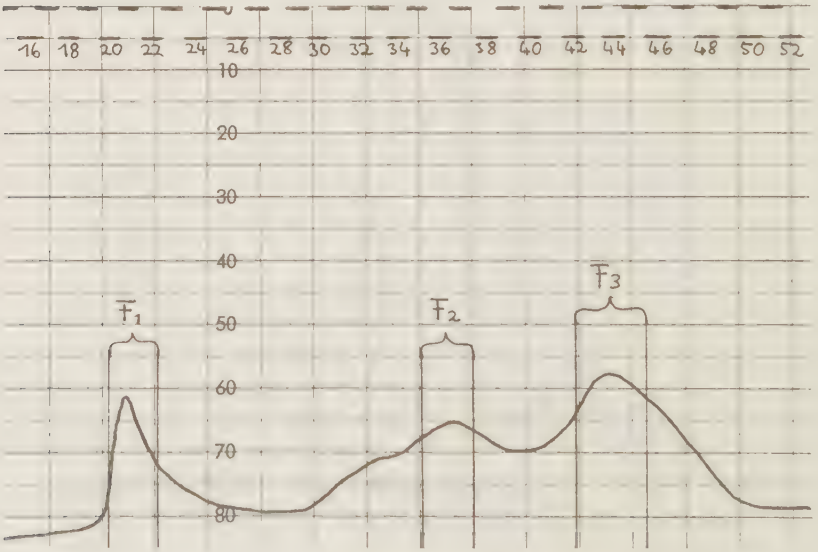

Abb. 3: Elutionskurve des Zystenwand-Antigens von S.ovifelis aufgetrennt an Ultrogel ACA 44 mit Darstellung der Fraktionen

Das Zystenwand-Antigen von S.ovifelis ergab 3 weniger ausgeprägte Fraktionen (Abb.3), während das Zystozoiten-Antigen von S.bovihominis nur einen, sehr flachen Peak erbrachte. Auch die beiden Sporozoiten-Antigene von S.suicanis und Sarcocystis spec. vom Reh (mit Endwirt Hund) ließen sich sowohl an ACA 22 als auch an ACA 44 nicht auftrennen.

1. Reaktionen verschiedener Sarkosporidien-Antigene im ELISA mit Seren von experimentell infizierten Tieren

Vor Beginn der Versuche mußte die Möglichkeit ausgeschlossen werden, daß die im ELISA auftretenden Reaktionen nicht nur durch Sarkosporidien-Antikörper, sondern auch durch Antikörper anderer zystenbildender Kokzidienarten hervorgerufen werden, also nicht bekannte Mischinfektionen der zu untersuchenden Tiere vorliegen. Hierzu setzte ich die Seren von Schweinen, Hunden und Kaninchen, die mit Toxoplasma gondii bzw. Hammondia hammondii infiziert waren, sowie die jeweiligen Negativ-Kontrollen mit dem Zystozoiten-Antigen von S.ovifelis und den beiden Sporozoiten-Antigenen an. Dabei kam es sowohl bei den Negativ-Kontrollen als auch bei den positiven Seren zu Titern bis 1:32. In der Regel waren die Titerhöhen der sich entsprechenden negativen und positiven Toxoplasma- und Hammondia-Seren bei allen 3 Tierarten gleich. War ein Unterschied vorhanden, betrug er nicht mehr als eine Stufe. Mit dem Sporozoiten-Antigen von S.suicanis lagen die Titer beim Hund zum Beispiel bei Toxoplasma-negativen Seren bei 0, bei Toxoplasma-positiven bei 1:16, bei Hammondia-negativen Seren bei 1:16, bei Hammondia-positiven bei 1:32. Die ebenfalls reagierenden Negativ-Kontrollen und die niedrigen Titer schließen Kreuzreaktionen zwischen Sarcocystis und Toxoplasma bzw. Hammondia aus und sind als unspezifische Reaktionen zu bewerten.

a) Die Untersuchung der Schweineseren im ELISA mit den verschiedenen Antigenen erbrachte Reaktionen mit Titern bis 1:256. Bedeutende Unterschiede der Serum-Titer bei den einzelnen Antigenen lagen nicht vor. Auffällig war jedoch, daß die F_2-Fraktion von S.ovifelis und die F_2-Fraktion von S.suihominis deutlich

schwächer reagierten als die jeweiligen F_1-Fraktionen und Gesamt-Antigene. Die Reaktionen mit den beiden Sporozoiten-Antigenen unterschieden sich kaum von denjenigen mit den Zystozoiten-Antigenen. Auch zwischen dem Zystozoiten- und Zystenwand-Antigen von S.ovifelis war kein Unterschied feststellbar. Aus den Titerhöhen des mit S.suihominis infizierten Ferkels S_2 wird ersichtlich, daß die Antikörperbildung am 128.Tag p.i. gegenüber S_1 (99.Tag p.i.) bereits nachgelassen hat (Tab.1). Das mit S.suicanis infizierte Schwein S_3, dessen Serum zu Beginn der Infektion gewonnen wurde, wies im Gegensatz zu S_4 sehr niedrige, nicht spezifische Titer auf. Das nicht infizierte Schwein S_5 blieb durchgehend negativ.

Die Titerverlaufskurve des mit S.suicanis experimentell infizierten Schweines HS 6 zeigt, daß bereits am 15.Tag p.i. ein leichter, jedoch nicht spezifischer Titeranstieg von 1:16 zu verzeichnen war, der am 40.Tag p.i. mit einem Titer von 1:64 deutlich wurde und seinen Höhepunkt am 70.Tag p.i., an dem das Schwein geschlachtet wurde, erreichte (Abb.4). Das viermal mit S.suicanis experimentell infizierte Schwein HS 5, das am 40., 70. und 100. Tag p.i. zum 2., 3. und 4. Mal infiziert worden war, wies schon am 26.Tag p.i. einen Titeranstieg von 1:64 auf und erreichte den Höhepunkt der Antikörperbildung bereits am 55.Tag p.i.. Dieser Titer von 1:128 blieb bis zur Schlachtung am 117.Tag p.i. konstant. Als Antigen für diese Untersuchungen im ELISA verwendete ich Zystozoiten-Antigen von S.ovifelis mit einer Eiweißkonzentration von 25 µg/ml.

Die Untersuchung der Seren von 2 mit S.suicanis experimentell infizierten Muttersauen am 48.Tag p.i. ergab jeweils einen Titer von 1:128. Eine Muttersau brachte am 8.Tag p.i., die andere am 22.Tag p.i. gesunde Ferkel zur Welt, deren Seren im ELISA reaktionlos blieben.

b) Die Antikörper-Titer der Rinder lagen ebenfalls im positiven Bereich. Eine Probeuntersuchung von Seren 28 gesunder Rinder mit dem Zystozoiten-Antigen von S.ovifelis ergab, daß 17 Tiere Titer bis 1:256 aufwiesen, 9 Tiere fragliche Ergebnisse (1:32) erbrachten und nur 2 Tiere negativ waren.

	Antigene	Seren von Schweinen infiziert mit S.suihominis S_1	S_2	S.suicanis S_3	S_4	S_5
Zystozoiten-Antigen	S.ovifelis Gesamt	1:256	1:64	1:16	1:256	-
	F_1	1:128	1:16	1:16	1:256	-
	F_2	1:32	-	-	1:64	-
	S.ovifelis Zystenwand	1:256	1:32	1:32	1:256	-
	F_1	1:128	1:32	1:16	1:128	-
	F_2	1:256	1:32	1:16	1:128	-
	F_3	1:128	1:32	1:16	1:64	-
	S.suihominis Gesamt	1:128	1:64	1:16	1:128	-
	F_1	1:256	1:64	1:32	1:128	-
	F_2	1:64	1:32	1:16	1:32	-
	S.ovicanis Gesamt	1:128	1:64	1:16	1:64	-
	F_1	1:128	1:64	1:16	1:128	-
	F_2	1:128	1:128	1:16	1:128	-
	S.bovihominis	1:256	1:64	1:16	1:128	-
	S.bovicanis	1:256	1:64	1:32	1:128	-
	S.suicanis	1:128	1:16	1:16	1:64	-
Sporozoiten-Antigen	S.suicanis	1:128	1:64	1:16	1:64	-
	S.spec. (Reh)	1:128	1:64	1:16	1:128	-

Tab. 1: Antikörper-Titer experimentell mit Sarcocystis suihominis bzw. S.suicanis infizierter Schweine dargestellt mit Zystozoiten- und Sporozoiten-Antigenen und Fraktionen im ELISA

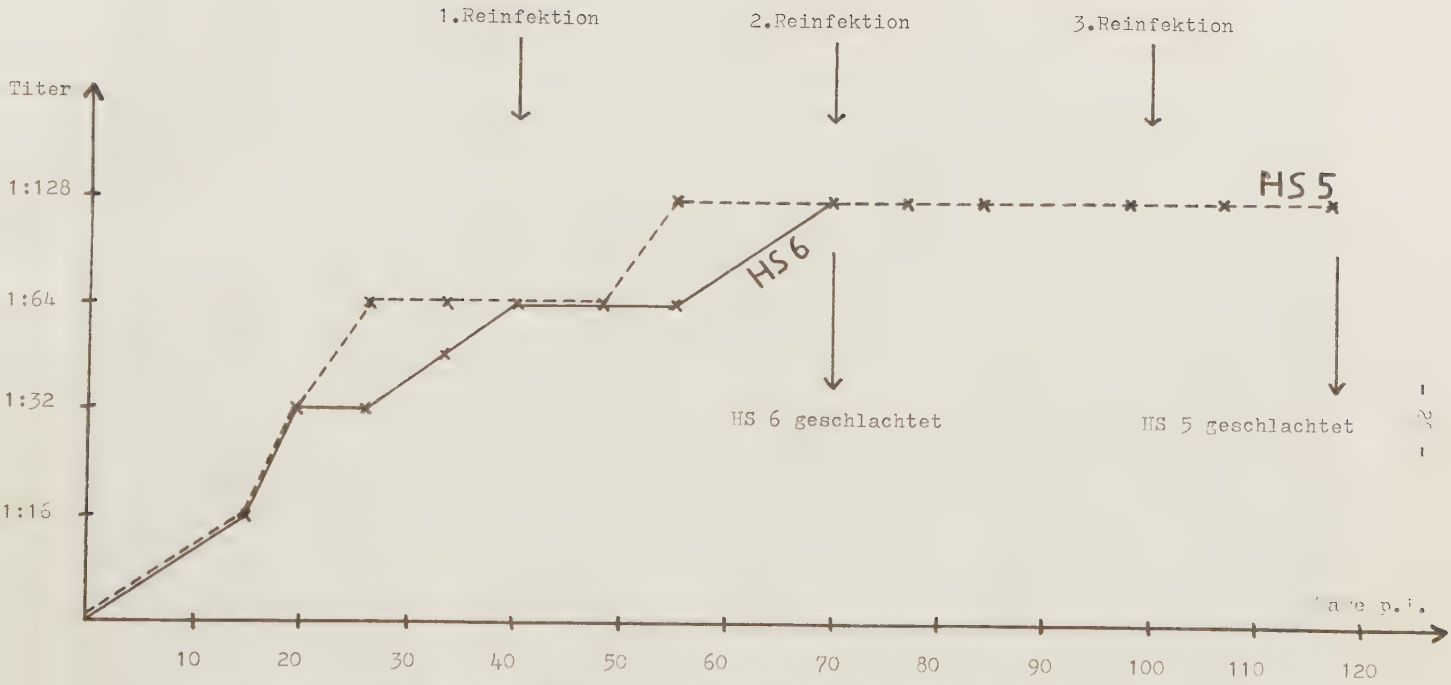

Abb. 4: Titerverlaufskurve des mit S.suicanis infizierten Schweines HS 6 (——) und des am 4., 20. und 100.Tag p.i. mit S.suicanis reinfizierten Schweines HS 5 (----) im IHSA mit Zysto-zoiten-Antigen von S.ovifelis

Die Titer des mit S.bovifelis experimentell infizierten Kalbes waren mit 1:64 bis 1:128 etwas niedriger als die der Schweine. Um festzustellen, ob im Verlauf der Infektion dieses Kalbes ein Titeranstieg nachweisbar ist, setzte ich die in bestimmten Abständen gewonnenen Seren im ELISA mit dem Zystozoiten-Antigen von S.ovifelis an, obwohl mir diese Seren erst ab dem 40.Tag p.i. zur Verfügung standen. Zu diesem Zeitpunkt lag der Antikörper-Titer bereits bei 1:32. Eine serologische Untersuchung vor der Infektion war nicht durchgeführt worden. Am 84.Tag p.i. stieg der Titer auf 1:64 an, erreichte am 100.Tag p.i. seinen Höhepunkt (1:128), fiel am 130.Tag p.i. wieder ab und blieb bis zur Schlachtung am 160.Tag p.i. bei 1:64; bei der mikroskopischen Untersuchung des Fleisches konnten zu dieser Zeit Zystozoiten nicht nachgewiesen werden. Die Reaktionen der vergleichsweise herausgenommenen Seren vom 40., 100., 114. und 160.Tag p.i. mit den übrigen Antigenen und Fraktionen bestätigten trotz einiger Schwankungen diese Ergebnisse mit S.ovifelis (Tab.2). Die Titerunterschiede bei den einzelnen Antigenen betrugen jedoch in keinem Fall mehr als eine Stufe.

c) Die Untersuchung der Hundeseren führte zu deutlichen Reaktionen mit Titern bis 1:256. 2 Hunde waren bereits 7 Monate vor der Serumgewinnung mit infiziertem Rehfleisch gefüttert worden und schieden daraufhin Sporozysten in großer Zahl aus. Das Serum des dritten Hundes wurde 5 Monate nach Verfütterung von infiziertem Hirschfleisch gewonnen. Die Titerhöhen dieses Hundes, bei dem nur eine geringe Sporozystenausscheidung stattgefunden hatte, lagen mit 1:16 bis 1:64 deutlich niedriger als diejenigen der beiden anderen Hunde (1:128 - 1:256); die Titer 1:16 und 1:32 sind als unspezifische Reaktionen zu bewerten. Keiner der Hunde schied zum Zeitpunkt der Serumgewinnung noch Sporozysten aus. Unterschiede der Serum-Titer bei den einzelnen Antigenen und Fraktionen waren nicht vorhanden oder betrugen nur eine Stufe. Auch die Ergebnisse bei beiden Sporozoiten-Antigenen stimmten nahezu mit denjenigen bei den Zystozoiten-Antigenen überein. Die Negativ-Kontrolle stammte von gnotobiotischen Hunden und blieb, abgesehen von einigen unspezifischen Reaktionen, negativ.

	Antigene	Seren eines Kalbes infiziert mit S.bovifelis 40 Tg. p.i.	1[illegible] Tg. p.i.	114 Tg. p.i.	160 Tg. p.i.	Negativ-Kontrolle
Zystozoiten-Antigen	S.ovifelis Gesamt	1:32	1:128	1:128	1:64	-
	F_1	1:32	1:64	1:128	1:64	-
	F_2	1:32	1:64	1:64	1:64	-
	S.ovifelis Zystenwand	1:32	1:128	1:128	1:64	-
	F_1	1:32	1:64	1:128	1:64	-
	F_2	1:32	1:128	1:64	1:32	-
	F_3	1:16	1:64	1:64	1:64	-
	S.suihominis Gesamt	1:32	1:128	1:128	1:64	-
	F_1	1:32	1:128	1:64	1:64	-
	F_2	1:16	1:64	1:64	1:32	-
	S.ovicanis Gesamt	1:32	1:128	1:64	1:64	-
	F_1	1:16	1:64	1:64	1:64	-
	F_2	1:32	1:128	1:128	1:64	-
	S.bovihominis	1:32	1:128	1:128	1:64	-
	S.bovicanis	1:32	1:128	1:128	1:64	-
	S.suicanis	1:16	1:64	1:128	1:32	-
Sporozoiten-Antigen	S.suicanis	1:16	1:64	1:128	1:64	-
	S.spec. (Reh)	1:32	1:64	1:128	1:64	-

Tab. 7: Antikörper-Titer eines Sarkosporidien-infizierten Kalbes und einer Negativ-Kontrolle dargestellt mit Zystozoiten- und Sporozoiten-Antigenen im ELISA

2. Anwendung des ELISA zum serologischen Nachweis von Sarkosporidien-Infektionen bei Rindern und Schweinen im Vergleich zum mikroskopischen Erreger-Nachweis

Die vergleichenden serologischen und mikroskopischen Untersuchungen von je 100 Rindern und Schweinen sollten klären, ob der ELISA für Routine-Untersuchungen geeignet ist und ob auf Grund der ermittelten Titerhöhen Rückschlüsse auf die Befallstärke gezogen werden können.

Von den 100 über 1 Jahr alten Rindern wurden jeweils etwa 30 g Schlundmuskulatur nach Trypsin-Verdauung mikroskopisch untersucht und die Befallstärke in schwach und stark positiv unterteilt. Gleichzeitig wurde im ELISA der Antikörper-Titer jedes Tieres mit dem Zystozoiten-Antigen von S.ovifelis ermittelt. Von den insgesamt 100 Tieren wiesen 12 einen Titer von 1:16 auf, der als fraglich zu bewerten ist, 45 Tiere zeigten Titer von 1:32, 32 Tiere hatten einen Titer von 1:64 und 11 einen Titer von 1:128. Alle 12 Rinder mit einem Titer von 1:16 waren mikroskopisch schwach positiv. Von den 45 Tieren mit einem Titer von 1:32 erwiesen sich 36 als schwach, 7 als stark positiv und 2 als negativ. Bei einem Titer von 1:64 zeigten sich von den 32 Rindern 26 schwach, 4 stark positiv und 2 negativ; die 11 Tiere mit einem Titer von 1:128 brachten 8 schwach und 3 stark positive Befunde (Tab.3). Über 2/3 der Tiere lagen mit ihren Titerhöhen im mittleren Bereich (1:32, 1:64). Nur 14 Rinder erwiesen sich mikroskopisch als stark, 82 dagegen als schwach positiv. 7 der mikroskopisch stark positiven Tiere erbrachten nur Titer von 1:32, 8 schwach positive dagegen Titer von 1:128. Nur 4 der untersuchten Rinder waren mit Titern von 1:32 und 1:64 mikroskopisch negativ. Eine Beziehung zwischen mikroskopisch nachweisbarer Befallstärke und Titerhöhe konnte also nicht festgestellt werden.

Titer-Höhe	Anzahl Tiere	mikroskop. Erreger-Nachweis		
		schwach positiv	stark positiv	negativ
1:16	12	12	-	-
1:32	45	36	7	2
1:64	32	26	4	2
1:128	11	8	3	-
Insgesamt	100	82	14	4

Tab. 3: Untersuchung von 100 über 1 Jahr alten Rindern auf Antikörper gegen Sarkosporidien im ELISA im Vergleich zum mikroskopischen Erreger-Nachweis

Bei den 100 Schweinen handelte es sich um 45 Mastschweine und 55 Zuchtsauen. Hier wurden im Gegensatz zu den Rindern etwa 30 g Zwerchfellmuskulatur mikroskopisch untersucht. Bei allen 45 Mastschweinen konnten mikroskopisch keine Zystozoiten nachgewiesen werden. Ihre Titer reichten bis 1:32. Titer von 1:16 und 1:32 sind als fraglich anzusehen. Von den 55 Sauen waren nur 12 mikroskopisch schwach positiv, wobei 3 Tiere Titer von 1:32, 4 Titer von 1:64 und 5 Titer von 1:128 aufwiesen. Die Titerhöhen der 43 mikroskopisch negativen Sauen schwankten zwischen 0 und 1:32 (Tab.4). Im Unterschied zu den Rindern konnte bei den Schweinen eine Beziehung zwischen mikroskopischem und serologischem Ergebnis gefunden werden. Die Mehrzahl der mikroskopisch positiven Tiere (9 von 12 Sauen) war auch serologisch

Titer-höhe	Anzahl Tiere	mikroskop. Erreger-Nachweis	
		positiv	negativ
<1:16	4	-	4
1:16	20	-	20
1:32	22	3	19
1:64	4	4	-
1:128	5	5	-
Insgesamt	55	12	43

Tab. 4: Untersuchung von 55 Sauen auf Antikörper gegen Sarkosporidien im ELISA im Vergleich zum mikroskopischen Erreger-Nachweis

deutlich positiv (1:64 - 1:128). Mikroskopisch negative Sauen erreichten in keinem Fall höhere Titer als 1:32. Trotzdem kann nicht mit Sicherheit von der Titerhöhe auf die Befallstärke geschlossen werden, da 3 mikroskopisch positive Sauen Titer von 1:32 aufwiesen und dieser Titer auch bei 19 der 45 mikroskopisch negativen Mastschweine festgestellt wurde.

IV. Besprechung der Ergebnisse

Ziel meiner Arbeit war es, Zystozoiten- und Sporozoiten-Antigene verschiedener Sarkosporidienarten in möglichst reiner Form aufzubereiten, ihre Anwendung im ELISA zu untersuchen und festzustellen, ob dieser Test zur Diagnose von Sarkosporidien-Infektionen und zur Artendifferenzierung geeignet ist.

Nachdem AWAD (1958) und andere Autoren die KBR erfolgreich zur Diagnose von Sarkosporidien-Infektionen verwendeten und LUNDE und FAYER (1976) mit dem IHA sowie NEDJARI, JUNGMANN und HIEPE (1976) mit dem IFAT Sarkosporidien-Antikörper nachweisen konnten, ergaben meine Untersuchungen, daß auch der ELISA zum Nachweis einer Sarkosporidien-Infektion anwendbar ist.
Um sicherzugehen, daß die im ELISA erzielten Reaktionen der Hunde- und Schweineseren mit den Sarkosporidien-Antigenen nicht auf Mischinfektionen mit anderen zystenbildenden Kokzidienarten zurückzuführen sind, setzte ich im ELISA die Seren von experimentell mit Toxoplasma und Hammondia infizierten Schweinen, Hunden und Kaninchen mit Sarkosporidien-Antigenen an. Die hierbei erzielten Reaktionen mit Titern von 1:16 und 1:32 sind sicherlich nicht als positives Ergebnis zu bewerten, da auch die entsprechenden Negativ-Kontrollen gleiche oder nur um eine Stufe niedrigere Werte aufwiesen. Die Ergebnisse zeigen, daß auch mit dem ELISA offensichtlich keine Kreuzreaktionen zwischen Sarcocystis und Toxoplasma sowie Hammondia nachweisbar sind. Sie bestätigen hiermit die Untersuchungen von PIEKARSKI und SAATHOFF (1961) mit der KBR, von DE ANDRADE und WEILAND (1971) mit der Mikro-Agar-Präzipitation und dem IFAT sowie von TADROS, LAARMANN und VON DEN EIJK (1974) mit dem IFAT, in welchen ebenfalls keine Antigen-Gemeinschaft festgestellt werden konnte.

Bei den Zwischenwirten Schwein und Rind konnten im ELISA positive Ergebnisse erzielt werden.
Die Titerwerte der Schweineseren reichten bis 1:[illegible]. Deutliche Titerunterschiede zwischen den Testansätzen mit Zystozoiten- und Sporozoiten-Antigenen sowie mit den Antigenen der verschie-

denen Sarkosporidienarten lagen nicht vor, gleichgültig, ob nun das Schwein Zwischenwirt der betreffenden Art ist oder nicht. Unterschieden um eine Stufe ist keine Bedeutung beizumessen, da auch wiederholte Tests mit den gleichen Ansätzen Titerunterschiede dieser Art aufwiesen.
Die Titerhöhen der F_2-Fraktion von S.ovifelis und der F_2-Fraktion von S.suihominis jedoch setzten sich innerhalb des jeweiligen Komplexes deutlich von den übrigen Werten ab. Möglicherweise hat eine unterschiedliche Antigenverteilung in den Fraktionen stattgefunden, die sich bei den einzelnen Tierarten verschieden stark äußert.
Die Ergebnisse der beiden mit S.suihominis infizierten Ferkel S_1 und S_2 zeigen, daß es zwischen 99. und 128.Tag p.i. bereits zu einem Titerabfall gekommen war. Wie die Titerverlaufskurve des insgesamt viermal mit S.suicanis infizierten Schweines HS 5 zeigt, hatte hier jedoch bei der Schlachtung am 117.Tag p.i. noch kein Titerabfall stattgefunden. Die 3 zusätzlichen Infektionen nach der Erstinfektion - die letzte war 17 Tage vor der Schlachtung - haben den Antikörperspiegel möglicherweise konstant gehalten. Die Titerhöhen dieses Schweines lagen jedoch bereits vor der 2. Infektion am 40.Tag p.i. eine Stufe über denjenigen des einmal infizierten Schweines HS 6, das den Höhepunkt am 70.Tag p.i., dem Tag der Schlachtung und somit 15 Tage später als HS 5 erreichte. Obwohl die Antikörperbildung des viermal infizierten Schweines bis zum 70.Tag p.i. etwas schneller erfolgte, kann dies nicht auf die eine, in diesem Zeitraum zusätzlich stattgefundene Infektion zurückgeführt werden. Der erste, raschere Titeranstieg von HS 5 war bereits vor der Zweitinfektion zu verzeichnen; beide Tiere erreichten einen Titer von 1:128, der nicht überschritten wurde. Demzufolge handelte es sich bei dem unterschiedlichen Titerverlauf sicherlich nur um individuelle Schwankungen der Antikörperbildung.
Eine Bestätigung wäre auch in den Ergebnissen zu sehen, welche die Untersuchung der Seren von 2 mit S.suicanis infizierten Muttersauen erbrachte. Beide Tiere wiesen schon am 48.Tag p.i. einen Titer von 1:128 auf. Die Tatsache, daß die Ferkel beider

Sauen im ELISA negativ blieben, kann damit begründet werden, daß die Geburt bei einer Sau 8 Tage, bei der anderen 22 Tage p.i. erfolgte, die Bildung von Antikörpern und somit deren Übertragung mit der Kolostralmilch also noch nicht oder in nur sehr geringem Maße stattgefunden hatte.

Auch bei den Rinderseren konnten im ELISA gute Reaktionen mit Titern bis 1:256 erzielt werden, wie die Probeuntersuchung von 28 Seren gesunder Rinder zeigte. Im Gegensatz dazu reichten die Titerhöhen des mit S.bovifelis infizierten Kalbes nicht über einen Titer von 1:128 hinaus und lagen damit insgesamt etwas niedriger als die der Schweine. Auch hier betrug der Titerunterschied bei den einzelnen Antigenen und Fraktionen nicht mehr als eine Stufe, wodurch eine Differenzierung der Sarkosporidienarten nicht möglich war. Das foetale Kälberserum hat zwar als Negativ-Kontrolle wenig Aussagekraft, da es noch keine Immunglobuline enthält, wurde aber trotzdem von mir verwendet, da eindeutig negatives Serum auf Grund der fast 100 %igen Befallstärke unserer Rinder nicht zu beschaffen war, und auch neugeborene Kälber über die Kolostralmilch Antikörper der Mutter aufgenommen haben könnten. Obwohl mir die Seren des untersuchten Kalbes erst ab dem 40.Tag p.i. zur Verfügung standen, und zu diesem Zeitpunkt bereits ein Titer von 1:32 vorlag, konnte vom 65. bis 100.Tag p.i. ein deutlicher Titeranstieg verzeichnet werden. Am 120.Tag p.i. fiel der Titer wieder ab, blieb jedoch bis zur Schlachtung bei 1:64, obwohl das Fleisch zu diesem Zeitpunkt mikroskopisch keine Zystozoiten aufwies. Eine direkte Beziehung zwischen Befallstärke und Titerhöhe kann demzufolge in diesem Fall nicht hergestellt werden, da das mikroskopisch negative Kalb am 160.Tag p.i. trotzdem einen Titer aufwies.

Die relativ hohen Werte von 2 der 3 Hunde überraschten insofern, als die Verfütterung von infiziertem Rehfleisch bereits 7 Monate zurücklag und zum Zeitpunkt der Serumgewinnung keine Sporozystenausscheidung mehr stattgefunden hatte. Die durchgehend niedrigen Titer des mit infiziertem Hirschfleisch gefütterten Hundes, der nur wenige Sporozysten ausgeschieden hatte, sind möglicherweise auf die Aufnahme nur geringer Mengen des Infek-

tionsmaterials zurückzuführen. Es ist jedoch bei der langen Zeitspanne zwischen Infektion und serologischer Untersuchung fraglich, ob die im ELISA aufgetretenen Reaktionen in diesem Fall tatsächlich auf Sarkosporidien-Antikörper zurückzuführen sind. Mögliche Kreuzreaktionen auf Grund von nicht bekannten zwischenzeitlichen Infektionen z.B. mit Isosporaarten können nicht ausgeschlossen werden.

Wie die Untersuchung der Schweine-, Rinder- und Hundeseren im ELISA zeigte, konnten keine Unterschiede zwischen den Serum-Titern der Gesamt-Antigene und ihrer Fraktionen festgestellt werden. Trotz einiger Abweichungen, vor allem bei den Schweinen, die auf eine unterschiedliche Antigenverteilung in den Fraktionen schliessen lassen, wird aus den Ergebnissen ersichtlich, daß jede Fraktion einen mehr oder weniger ausgeprägten Antigencharakter besitzt. Eine Auftrennung der Sarkosporidien-Antigene, sofern sie überhaupt möglich ist, hat sich demzufolge als überflüssig erwiesen.
Aus der Tatsache, daß alle von mir verwendeten Antigene mit den verschiedenen Seren zu ähnlichen Ergebnissen geführt haben, kann der Schluß gezogen werden, daß die einzelnen Sarkosporidienarten, zumindest diejenigen, welche in meinen Versuchen verwendet wurden, miteinander kreuzreagieren, gleichgültig, ob es sich um Zystozoiten- oder Sporozoiten-Antigen handelt. Eine Artendifferenzierung ist also auf diesem Weg auch nach säulenchromatographischer Auftrennung der Antigene mit dem ELISA ebenso wenig möglich wie eine Unterscheidung zwischen Zystozoiten- und Sporozoiten-Antigenen. Es empfiehlt sich infolgedesssen, für serologische Routine-Untersuchungen mit dem ELISA das Zystozoiten-Antigen von S.ovifelis zu verwenden, da es in reinster Form und in großer Menge zu gewinnen ist. Dies schlugen auch TADROS, LAARMANN und VON DEN EIJK (1974) für die Routine-Serologie mit dem IFAT beim Menschen vor, als sie Kreuzreaktionen zwischen S.tenella und S.fusiformis feststellten. Da auch zwischen dem Zystozoiten- und dem Zystenwand-Antigen von S.ovifelis keine unterschiedlichen Reaktionen auftraten, könnten die aus Schafschlünden herauspräparierten Zysten als Ganzes zur Antigen-Herstellung verwendet

werden, sofern sie völlig frei von Muskelanteilen sind.

Auch für die serologische Untersuchung von je 100 Rindern und Schweinen fand das Cystozoiten-Antigen von S.ovifelis Verwendung. Die Ergebnisse dieser vergleichenden serologischen und mikroskopischen Untersuchung zeigten, daß bei 96 % der untersuchten, über 1 Jahr alten Rinder mikroskopisch Cystozoiten nachgewiesen werden konnten. Die Titerhöhen dieser mikroskopisch positiven Tiere schwankten zwischen 1:16 und 1:128. Allein 7 mikroskopisch stark positive Rinder hatten nur einen Titer von 1:32. Über 2/3 der untersuchten Tiere waren mikroskopisch schwach positiv; von diesen betrug der Titer bei 26 Tieren 1:64 und bei 8 1:128. Die 4 mikroskopisch negativen Rinder wiesen trotzdem Titer von 1:32 und 1:64 auf. Auf Grund der Tatsache, daß mikroskopisch schwach positive Tiere auch hohe Titer und stark positive Tiere niedrige Titer erbrachten, kann bei den Rindern keine direkte Beziehung zwischen Befallstärke und Titerhöhe hergestellt werden. Möglicherweise beginnt die Antikörperbildung bereits im Schizonten-Stadium, in dem mikroskopisch noch keine Erreger nachgewiesen werden können. Dies würde die positiven Titer der 4 mikroskopisch negativen Tiere erklären.
Bei den Schweinen hingegen konnte ein gewisser Zusammenhang zwischen Befallstärke und Titerhöhe festgestellt werden. 9 der 12 mikroskopisch positiven Sauen wiesen auch eindeutige Titer auf. Die mikroskopisch negativen Sauen und Mastschweine erreichten in keinem Fall höhere Titer als 1:32. Da jedoch bei der serologischen Untersuchung neben 3 mikroskopisch positiven Sauen auch 19 der 45 mikroskopisch negativen Mastschweine einen Titer von 1:32 erbrachten, ist dieser Titer eher als unspezifisch anzusehen und nicht, wie bei den Rindern, auf eine möglicherweise beginnende Antikörperbildung im Schizonten-Stadium zurückzuführen.
Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, daß der ELISA auch für Routine-Untersuchungen auf Sarkosporidien, vor allem beim Schwein, geeignet ist.

Der ELISA hat sich nach meinen Untersuchungen als serologischer Test zum Nachweis einer Sarkosporidien-Infektion beim Zwischenwirt als geeignet erwiesen. Um diese Aussage auch für den Endwirt machen zu können, müßten weitere Nachforschungen über die Immunantwort des Hundes nach Infektion mit Sarkosporidien gemacht werden. Eine Artendifferenzierung ist mit diesem Test jedoch nicht möglich.

V. Zusammenfassung

Seren von experimentell und natürlich mit Sarkosporidien infizierten Schweinen, Rindern und Hunden wurden im ELISA mit Zystozoiten- und Sporozoiten-Antigenen verschiedener Sarkosporidienarten untersucht.
Spezifische Sarkosporidien-Antikörper konnten bei den Zwischenwirten Schwein und Rind mit Titern von 1:64 bis 1:256 nachgewiesen werden. Ähnliche Titer waren beim Endwirt Hund festzustellen. Titerunterschiede der Seren aller 3 Tierarten mit den verschiedenen Antigenen waren nicht vorhanden oder betrugen nur eine Stufe. Eine Artendifferenzierung ließ sich auch nach säulenchromatographischer Auftrennung der Antigene mit dem ELISA nicht durchführen.
Bei der vergleichenden serologischen und mikroskopischen Untersuchung an Rindern konnte keine Beziehung zwischen Titerhöhe und Befallstärke hergestellt werden. Mikroskopisch stark positive Tiere wiesen auch niedrige Titer, mikroskopisch negative Tiere auch hohe Titer auf. Dagegen erreichten mikroskopisch negative Schweine in keinem Fall höhere Titer als 1:32, mikroskopisch positive Tiere entwickelten in der Regel Titer über 1:32. Kreuzreaktionen zwischen Sarcocystis und Toxoplasma bzw. Hammondia konnten ausgeschlossen werden.

Summary

The detection of Sarcocystis infections in domestic animals by means of the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).

Sera of pigs, cattle, and dogs experimentally and naturally infected with Sarcocystis were tested by means of ELISA for Sarcocystis antibodies. Antigens employed were watersoluble extracts of cystocoites and sporocoites of different Sarcocystis species.

Specific antibodies against Sarcocystis could be demonstrated with titres from 1:64 to 1:256 in sera of pigs and cattle (intermediate hosts). Comparable titres occurred in sera of dogs (final host). In sera of all 3 animal species tested differing titre steps were not obtained using different antigens. The distinction of Sarcocystis species by means of ELISA was not possible even after columnchromatography of the antigens.

No correlation became evident between titres and intensity of infection in cattle, i.e. heavily infected animals showed also low titres and microscopically negative animals high titres. Microscopically negative pigs, on the contrary, never showed titre values above 1:32, while positive animals usually developed titres higher than 1:32.

Serologic crossreactions between Sarcocystis and Toxoplasma respectively Hammondia could be excluded.

VI. Literaturverzeichnis

1. de Andrade, C.M., G. Weiland (1971): Serologische Untersuchungen zur Feststellung gemeinsamer Antigene von Toxoplasmen, Sarkosporidien und Kokzidien.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 84, 61-63

2. Arcay-de-Peraza, L. (1966): The use of Sarcocystis tenella "spores" in a new agglutination test for sarcosporidiosis.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 60, 761-765

3. Aryeetey, M.E., G. Piekarski (1976): Serologische Sarcocystis-Studien an Menschen und Ratten.
Z. Parasitenk. 50, 109-124

4. Aryeetey, M.E., G. Piekarski (1978): Diaplazentarer Übergang von Sarcocystis-Antikörpern bei Mensch und Ratte.
Z. Parasitenk. 56, 211-218

5. Atkinson, E.M. (1977): The use of electrophoresis in the identification of Sarcocystis.
V. Internat. Congr. Protozool.
Abstract 421

6. Awad, F.I. (1958): The complement-fixation test in the diagnosis of sarcosporidiosis.
Am. J. Vet. Res. 19, 1010-1012

7. Craige, J.E. (1977): Sarcocystis of domestic animals.
J. Am. Vet. Med. Ass. 170, 463, 466

8. Dubey, J.P. (1976): Sarcocystis of domestic animals and of other coccidia of cats and dogs.
J. Am. Vet. Med. Ass. 169, 1061-1078

9. Engvall, E., P. Perlmann (1972): Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay, ELISA III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes.
J. Immunol. 109, 129-135

10. Erber, M. (1977): Möglichkeiten des Nachweises und der Differenzierung von zwei Sarcocystis-Arten des Schweines.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 90, 480-482

11. Erber, M., J. Meyer, J. Boch (1978): Aborte beim Schwein durch Sarkosporidien (Sarcocystis suicanis).
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 91, 393-395

12. Fayer, R., A.J. Johnson (1973): Development of Sarcocystis fusiformis in calves infected with sporocysts from dogs.
J. Parasit. 59, 1135-1137

13. Fayer, R., A.J. Johnson, M. Lunde (1976): Abortion and other signs of disease in cows experimentally infected with Sarcocystis fusiformis from dogs.
J. Infect. Diseases 134, 624-628

14. Fayer, R., M.N. Lunde (1977): Changes in serum and plasma proteins and in IgG and IgM antibodies in calves experimentally infected with Sarcocystis from dogs.
J. Parasit. 63, 438-442

15. Frenkel, J.K., R.L. Hoff, J.E. Cessna (1972): Spherical beads as filters: Separation and size determination of coccidia.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 140, 747-749

16. Gestrich, R., A.O. Heydorn, N. Bayšu (1975): Beiträge zum Lebenszyklus der Sarkosporidien.
VI. Untersuchung zur Artendifferenzierung bei Sarcocystis fusiformis und Sarcocystis tenella.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 88, 191-197, 201-204

17. Gestrich, R., M. Schmitt, A.O. Heydorn (1974): Pathogenität von Sarcocystis tenella-Sporozysten aus den Fäzes von Hunden für Lämmer. Kurzmitteilung.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 87, 362-363

18. Heydorn, A.O. (1977): Beiträge zum Lebenszyklus der Sarkosporidien.
IX. Entwicklungszyklus von Sarcocystis suihominis n. spec..
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 90, 218-224

19. Leek, R.G., R. Fayer, A.J. Johnson (1977): Sheep experimentally infected with Sarcocystis from dogs.
I. Disease in young lambs.
J. Parasit. 63, 642-650

20. Leek, R.G., R. Fayer (1978): Sheep experimentally infected with Sarcocystis from dogs.
II. Abortion and disease in ewes.
Cornell Vet. 68, 108-123

21. Lunde, M.N., R. Fayer (1976): Serologic tests for antibody to Sarcocystis in cattle.
J. Parasit. 63, 222-225

22. Mühlpfordt, H. (1951): Das Verhalten Sarkosporidien-infizierter Tiere im Sero-Farbtest auf Toxoplasmose nach Sabin-Feldman.
Z. Tropenmed. Parasit. 3, 205-215

23. Munday, B.L. (1975): The prevalence of sarcosporidiosis in Australian meat animals.
Australian Vet. J. 51, 478-480

24. Munday, B.L., A. Carbould (1974): The possible role of the dog in the epidemiology of ovine sarcosporidiosis.
Br. Vet. J. 130, IX-XI

25. Nedjari, T., R. Jungmann, T. Hiepe (1976): Immundiagnostischer Nachweis einer experimentellen Sarcocystis bovicanis-Infektion beim Rind mit der indirekten Fluoreszenz-Antikörper-Reaktion.
Mhfte. Vet. Med. 31, 946-947

26. Piekarski, G., M. Saathoff (1961): Vergleichende serologische Untersuchungen mit Sarkosporidien- und Toxoplasma-Antigenen.
Z. Parasitenk. 21, 363-380

27. Piekarski, G., W. Schäfer, R. Niederländer (1961): Mikroskopische und serologische Studien über die Häufigkeit von Sarcocystis tenella bei Schafen.
Z. Parasitenk. 20, 479-488

28. Ruitenberg, E.J., P.A. Steerenberg, B.J.M. Brosi (1975): Micro-System for the application of ELISA in the serodiagnosis of Trichinella spiralis infections.
Medikon 4, 30-31

29. Ruitenberg, E.J., P.A. Steerenberg, B.J.M. Brosi, J. Buys (1974): Serodiagnosis of Trichinella spiralis infections in pigs by Enzyme Linked Immunosorbent Assays.
Bull. WHO 51, 108-109

30. Schmidt-Hoensdorf, F., J. Holz (1953): Versuche zur Klärung der serologischen Verwandtschaft zwischen Sarcoplasmen und Toxoplasmen.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 66, 12-13

31. Shukla, D., D.A. Victor (1976): The complement fixation test in the diagnosis of sarcosporidiosis in bovines.
Indian Vet. J. 53, 852-854

32. Tadros, W., J.J. Laarmann, A.A. von den Eijk (1974): The demonstration of antibodies to Sarcocystis fusiformis antigen in sera of Isospora hominis carriers, using the indirect fluorescence technique.
Z. Parasitenk. 43, 221-224

33. Tanabe, K., I. Kimata, M. Iseki, S. Takada (1977): Separation of Toxoplasma tachyzoites by filtrating peritoneal exsudate of infected mice through cellulose powder.
Jap. J. Parasit. 26, 113-115

34. Voller, A., A. Bartlett, D.E. Bidwell (1976): Enzyme immunoassays for parasitic diseases.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 70, 98-106.

Herrn Prof. Dr. Dr.h.c. J. Boch gilt mein besonderer Dank für die Erstellung des Themas und die wissenschaftliche Anleitung. Er hat diese Arbeit unter besten Bedingungen ermöglicht.

Für die freundliche Beratung und praktische Unterstützung bei den Versuchen möchte ich Herrn Dr. Weiland herzlich danken.

Herrn Dr. Erber danke ich für die hilfsbereite Überlassung von Untersuchungsmaterial und die fachlichen Ratschläge.

Lebenslauf

Am 5.8.1952 wurde ich als zweites Kind des Chemikers Dr. Guido Umbach und seiner Ehefrau Helga, geborene Voges, in Bielefeld geboren.
1954 zog meine Familie nach München, wo ich von 1958 bis 1962 die Volksschule in Solln, anschließend von 1962 bis 1972 das Gymnasium in Icking besuchte. Im Juni 1972 legte ich das Abitur ab.
Im Wintersemester 1972/73 begann ich mit dem Studium der Tiermedizin an der Universität München, bestand hier am 4.11.1977 die Tierärztliche Prüfung und erhielt am 13.2.1978 die Approbation.
Am 10.6.1978 heiratete ich den Tierarzt Dr. Roland Klima.